



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 41 12 999 A 1**

⑤1 Int. Cl. 5:
G 01 N 33/564
C 12 Q 1/533
// C12N 11/08, 11/06,
11/10, 11/02

②1 Aktenzeichen: P 41 12 999.7
②2 Anmeldetag: 20. 4. 91
④3 Offenlegungstag: 22. 10. 92

DE 41 12 999 A 1

⑦1 Anmelder:
Ritter, Klaus, Dr.med., 3406 Bovenden, DE

⑦4 Vertreter:
Rehberg, E., Dipl.-Ing., Pat.-Anw., 3400 Göttingen

⑦2 Erfinder:
gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤4 Verfahren und Nachweismittel zum Nachweis von Autoantikörpern, die als Reaktion auf eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus gebildet wurden
- ⑤7 Ein Verfahren dient zum Nachweis von Autoantikörpern, die als Reaktion auf eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus gebildet wurden, in einer Lösung durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit einem erkennenden Antigen. Als erkennendes Antigen wird mindestens ein Teil des Proteins Triosephosphat-Isomerase verwendet.

DE 41 12 999 A 1

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und ein Nachweismittel zum Nachweis von Autoantikörpern, die als Reaktion auf eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus gebildet wurden, in einer Lösung durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit einem erkennenden Antigen. Das Epstein-Barr Virus ist der Erreger der infektiösen Mononukleose. Die infektiöse Mononukleose weist ein Krankheitsbild auf, welches dem einer akuten Leukämie sehr ähnlich ist. Die Heilungschancen bei Leukämie sind hoch, sofern massiv in den betroffenen Mechanismus eingegriffen wird. Bei Kindern ist die Erfolgsquote größer als 90%. Infektiöse Mononukleose erfordert hingegen keine drastischen therapeutischen Maßnahmen. Aus diesem Grunde ist es bei entsprechenden Krankheitsbildern notwendig, einen eindeutigen Test auf das Vorliegen einer infektiösen Mononukleose durchzuführen, um dem betroffenen Patienten überflüssige und schwerwiegende Maßnahmen zu ersparen.

Ein Verfahren der eingangs beschriebenen Art ist bekannt. Bei ihm wird als erkennendes Antigen das Viruskapsidantigen (VCA) verwendet. Das Viruskapsidantigen erkennt einen Antikörper der Klasse M (IgM), der im menschlichen Blut als Reaktion auf das Auftreten des Epstein-Barr Virus gebildet wird. Vorteilhaft an diesem Verfahren ist, daß es sich um eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion handelt. Das IgM anti-VCA tritt nur bei einer Epstein-Barr Virus Infektion auf. Mit dem Nachweis der Epstein-Barr Virus spezifischen Antikörper kann jedoch nicht in jeder zeitlichen Phase der Erkrankung die richtige Diagnose gestellt werden. So ist die Diagnose einer 2 bis 3 Monate zurückliegenden frischen Infektion, einer chronischen Infektion oder einer Reaktivierung einer Epstein-Barr-Virus-Infektion in einem erheblichen Teil der Fälle unsicher oder gar unmöglich. Nachteilig bei dem Verfahren ist weiterhin, daß die Beobachtung der Antigen-Antikörper-Reaktion aufwendig ist und bei der Analyse Übung und Erfahrung fordert. Zudem liegt der Zeitaufwand im-Bereich einiger Stunden bei einem hohen apparativen Aufwand. Wirtschaftlich kann das Verfahren daher nur in großen Laboratorien mit hohem Probenaufkommen durchgeführt werden.

Bei einem Verfahren zum Nachweis von heterophilen Antikörpern, die als Reaktion auf eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus gebildet wurden, in einer Lösung durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit einem erkennenden Antigen ist es bekannt, als erkennendes Antigen Formalinbehandelte Pferde-Erythrozyten oder Schaf-Erythrozyten zu verwenden. Dieses Verfahren hat den Vorteil äußerster Schnelligkeit. Die heterophilen Antikörper führen zu einer mit dem menschlichen Auge sichtbaren Agglutination. Als nachteilig stellt sich jedoch heraus, daß relativ häufig das Vorliegen einer infektiösen Mononukleose nicht erkannt wird. Dies ist darauf zurückzuführen, daß an der Antigen-Antikörper-Reaktion nur ein heterophiler Antikörper beteiligt ist. Das heißt, es handelt sich um einen Antikörper, der nicht direkt gegen das Epstein-Barr Virus gerichtet ist, sondern nur im Zusammenhang mit diesem mit gewisser Wahrscheinlichkeit auftritt. Ebenfalls auftretende falsch positive Ergebnisse lassen sich zwar durch eine sogenannte Differentialagglutination unter Verwendung von Meerschweinchenhierenextrakt oder Ochsenerythrozyten reduzieren, hierdurch verliert das Verfahren jedoch an seiner Einfachheit. Als größtes Problem stellt sich jedoch heraus, daß gerade Kinder die mit dem Epstein-

Barr Virus infiziert sind, die dem Verfahren zugrunde liegenden heterophilen Antikörper nicht bilden. Gerade in dem Bereich, wo es besonders wichtig ist, die Fälle mit infektiöser Mononukleose von denen mit akuter Leukämie zu trennen, ist das bekannte, schnelle Verfahren also überfordert. Die Fehlerquote bei Kindern bis zum 12. Lebensjahr beträgt bei dem als Bunnell-Reaktion bekannten Test auf die heterophilen Antikörper bis zu 65%. Wegen der einfachen Handhabbarkeit ist die Bunnell-Reaktion als serologischer Nachweis einer Epstein-Barr Virus Infektion dennoch weit verbreitet.

Zur Sichtbarmachung einer erfolgten Antigen-Antikörper-Reaktion sind verschiedene Verfahren bekannt.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren der eingangs beschriebenen Art weiterzubilden, so daß es schnell sowie zuverlässig durchzuführen ist und damit einen sofortigen Rückschluß auf das Vorliegen einer infektiösen Mononukleose zuläßt.

Erfindungsgemäß wird dies dadurch erreicht, daß als erkennendes Antigen mindestens ein Teil des Proteins Triosephosphat-Isomerase (TIM) verwendet wird. Das Protein Triosephosphat-Isomerase erkennt einen Autoantikörper, der in jedem Fall durch das Epstein-Barr Virus im infizierten Organismus induziert wird und damit im Blutserum dieses Organismus grundsätzlich vorliegt. Eine Testserie von 6000 Proben hat ergeben, daß immer dann, wenn IgM-Antikörper gegen das virale Capsid des Virus vorhanden sind, auch anti-TIM Antikörper vorliegen. Falsch negative Ergebnisse des neuen Verfahrens wurden nicht beobachtet. Falsch positive Ergebnisse wurden nur bei immun supprimierten Patienten, wie beispielsweise nach Organtransplantationen beobachtet. Ferner treten positive Ergebnisse in etwa 35% der Fälle akuter Hepatitis A-Virus Infektionen auf. Dies ist jedoch nicht weiter von Nachteil, da bei einer Vorgeschichte und einem Blutbild, die nicht sicher zu einer Epstein-Barr Virus Infektion passen, in jedem Fall das Vorliegen einer akuten Hepatitis A-Virus Infektion abgeklärt werden muß. Bei vielen anderen Virusinfektionen tritt der Autoantikörper gegen TIM in vorteilhafter Weise nicht auf. Dies gilt beispielsweise für die Infektionen durch das Hepatitis B Virus, das Herpes simplex Virus, das Varizella-Zoster Virus, das Rötelnvirus, das Cytomegalovirus, das Mumpsvirus und das Masernvirus. Als ausgesprochen vorteilhaft, erweist sich, daß der anti-TIM-Autoantikörper beim Auftreten der klinischen Symptomatik einer infektiösen Mononukleose im Blutserum des betroffenen Patienten bereits in maximaler Konzentration vorliegt, während viele Patienten zu diesem Zeitpunkt noch keine heterophilen Antikörper gebildet haben. Zudem ist das neue Verfahren äußerst schnell durchzuführen. Es bietet sich als vollständiger Ersatz für den Nachweis der heterophilen Antikörper und als teilweiser Ersatz bzw. sinnvolle Ergänzung zum Nachweis der spezifischen Antikörper des Epstein-Barr Virus an. Das neue Verfahren läßt sich analog zu allen bekannten Verfahren zum Nachweis von Antikörpern auf der Basis von Antigen-Antikörper-Reaktionen vollziehen und ist in vielen Fällen mit dem bloßen Auge auswertbar. Als Antigen ist in dem neuen Verfahren sowohl das vollständige Protein Triosephosphat-Isomerase als auch nur ein Teil dieses Proteins verwendbar. Triosephosphat-Isomerase besteht aus zwei identischen Einheiten mit je 248 Aminosäuren. Sowohl das ganze Molekül als auch die Untereinheiten für sich erkennen den Autoantikörper des Epstein-Barr Virus. Nach dem Zerlegen der Untereinheiten mit Hilfe von Bromzyan, bilden sich drei Fragmente. Das Frag-

ment 1 umfaßt hierbei die Aminosäuren in Position 1 (Alanin) bis Position 13 (Lysin), Fragment 2 reicht von der Aminosäure in Position 15 (Asparaginsäure) bis 81 (Glycin), Fragment 3 reicht von Position 83 (Isoleucin) bis 248 (Glutaminsäure). Es hat sich herausgestellt, daß sowohl das Fragment 2 als auch das Fragment 3 funktionale Bereiche besitzen, die zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion mit dem Autoantikörper des Epstein-Barr Virus fähig sind.

Die folgenden Spezifikationen des neuen Verfahrens sind von anderen Verfahren zum Nachweis von Antikörpern durch Antigen-Antikörper-Reaktionen mit anderen erkennenden Antigenen im Prinzip bekannt.

Die Triosephosphat-Isomerase oder deren Teile können in an inerte Partikel gekoppelter Form verwendet werden. Durch eine erfolgreiche Antigen-Antikörper-Reaktion kommt es zu einer Agglutination der inerten Partikel. Diese ist mit bloßem Auge deutlich sichtbar. Auf diese Weise ist das Verfahren in wenigen Minuten durchführbar.

Die Triosephosphat-Isomerase oder deren Teile können in an Latexkugeln gekoppelter Form verwendet werden. Latexkugeln, d. h. Kugeln aus Polystyrol, stellen geeignete inerte Partikel zur Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Reaktion dar. Allgemein können an die Stelle von Latex auch inerte Materialien wie Teflon oder Agarose treten.

Die Triosephosphat-Isomerase oder deren Teile können in an humane Erythrozyten der Blutgruppe 0 gekoppelter Form verwendet werden. Auf diese Weise wird die Antigen-Antikörper-Reaktion durch die Agglutination der Erythrozyten sichtbar gemacht. Die Erythrozyten der Blutgruppe 0 reagieren nicht mit anderen in der Lösung, die in der Regel das Serum eines Patienten ist, enthaltenen Bestandteilen. Die Agglutination der Erythrozyten ist auch quantitativ auswertbar.

Die Triosephosphat-Isomerase oder deren Teile können in in fester Agarose gelöster Form verwendet werden, wobei die Lösung in Löcher in der Agarose eingebracht wird. In diesem Fall diffundiert die Lösung in die Agarose hinein. Beim Vorliegen von anti-TIM-Autoantikörpern, die als Reaktion auf eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus gebildet wurden, kommt es im Äquivalenzbereich zur Präzipitatbildung in Form eines Ringes um das Loch. Der Ringdurchmesser nach vorgegebener Zeit bei definierten Difusionsbedingungen läßt eine quantitative Analyse zu.

Die Antigen-Antikörper-Reaktion kann in Anwesenheit von Komplement durchgeführt werden, wobei anschließend ein Indikator für den verbleibenden Rest des Komplements dem Reaktionsprodukt zugegeben wird. Durch die Antigen-Antikörper-Reaktion werden die Antikörper aktiviert, so daß sie gleichzeitig Komplement binden. Der verbleibende Rest des Komplements ist ein Maß für die vorliegende Konzentration der Autoantikörper des Epstein-Barr Virus. Er wird durch einen Indikator sichtbar gemacht, der auf die Konzentration des Komplements anspricht.

Die Triosephosphat-Isomerase oder deren Teile können als eingebundener Bestandteil einer Lipidmembran verwendet werden, die sich bei erfolgreicher Antigen-Antikörper-Reaktion auflöst. Unter Verwendung der Triosephosphat-Isomerase oder deren Teile lassen sich Membranen herstellen, die in ihrem Zusammenhalt von einer erfolgreichen Antigen-Antikörper-Reaktion betroffen sind. Ein Durchbruch der Membran ist so ein sicheres Zeichen für das Vorliegen der anti-TIM-Autoantikörper, die als Reaktion auf eine Infektion mit dem Ep-

stein-Barr Virus gebildet wurden.

Nach der erfolgten Antigen-Antikörper-Reaktion kann eine markierende Folgereaktion durchgeführt werden. Bei einer erfolgten Bindung der Autoantikörper, die als Reaktion auf eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus gebildet wurden, an fixierte TIM oder deren Teile, können die Autoantikörper durch markierte Substanzen sichtbar gemacht werden, die mit ihnen eine Reaktion eingehen. Die Sichtbarkeit kann hierbei beispielsweise auf Enzymaktivitäten, dem Zerfall von Radionukliden oder der Emission von Lichtquanten basieren.

Das Nachweismittel für Autoantikörper, die als Reaktion auf eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus gebildet wurden, zur Durchführung des neuen Verfahrens weist mindestens einen Teil des Proteins Triosephosphat-Isomerase in gekoppelter oder fixierter Form auf. Durch die Kopplung oder Fixierung des Proteins tritt die Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen der Triosephosphat-Isomerase und dem Autoantikörper lokalisiert auf. Hierdurch wird sie direkt sichtbar oder ist zumindest einer Sichtbarmachung leicht zugänglich.

Das Nachweismittel kann aus humanen Zellen gewonnene Triosephosphat-Isomerase aufweisen. Das Protein Triosephosphat-Isomerase ist als Bestandteil humaner Zellen bekannt. Aus diesen ist es extrahierbar, so daß es letztlich in reiner Form vorliegt.

Die Erfindung wird im Folgenden anhand einiger Ausführungsbeispiele näher erläutert und beschrieben.

Beispiel 1

Triosephosphat-Isomerase (TIM) wird an Latexkugeln gekoppelt. Durch Mischen mit einem Serum, das Autoantikörper, die als Reaktion auf eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus gebildet wurden, kommt es zu einer Vernetzung der Latexkugeln. Diese Agglutination ist mit bloßem Auge beobachtbar.

Beispiel 2

100 mg TIM in 0,15 M Phosphatpuffer werden mit 2 ml einer 10%igen Erythrozytensuspension gemischt. Die Erythrozyten sind der Blutgruppe 0, Rhesus negativ zugeordnet und trypsinisiert. Die Suspension der Erythrozyten liegt ebenfalls in 0,15 M Phosphatpuffer vor. Zu der Mischung aus der Erythrozytensuspension und der TIM werden 2 ml einer frisch hergestellten 1%igen Glutaraldehydlösung in 0,15 M Phosphatpuffer gegeben. Diese Mischung wird dann 1 Stunde bei Zimmertemperatur gehalten und gelegentlich geschüttelt. Nach 10 minütigem Zentrifugieren bei 400 g wird der Überstand verworfen und das Erythrozytensediment zweimal mit Phosphatpuffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Erythrozytensediment in Phosphatpuffer resuspendiert. Die TIM liegt so in an humane Erythrozyten der Blutgruppe 0 gekoppelter Form vor. Wird sie nun mit einer zu testenden Lösung vermischt, wird eine Antigen-Antikörper-Reaktion durch eine Agglutination der Erythrozyten sichtbar.

Beispiel 3

1 g Agarose wird in 100 ml 66 mM Sörensen-Phosphatpuffer, pH 7,2 aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf 40°C werden 100 mg gereinigte TIM zugegeben. Das Agarose-TIM-Gemisch wird auf Glasplatten gegeben und zum Aushärten über Nacht auf 4°C abgekühlt.

Zur Durchführung des neuen Verfahrens werden etwa 4 mm große Löcher in den Agar gestanzt, die als Depot für die zu testende Lösung dienen. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37°C wird der Präzipitatsdurchmesser um das Depotloch gemessen. Zu einer Präzipitatbildung kommt es im Äquivalenzbereich der Autoantikörper des Epstein-Barr Virus und der Triosephosphat-Isomerase.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Autoantikörpern, die als Reaktion auf eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus gebildet wurden, in einer Lösung durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit einem erkennenden Antigen, dadurch gekennzeichnet, daß als erkennendes Antigen mindestens ein Teil des Proteins Triosephosphat-Isomerase (TIM) verwendet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Triosephosphat-Isomerase oder deren Teile in an inerte Partikel gekoppelter Form verwendet werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Triosephosphat-Isomerase oder deren Teile in an Latexkugeln gekoppelter Form verwendet werden.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Triosephosphat-Isomerase oder deren Teile in an humane Erythrozyten der Blutgruppe 0 gekoppelter Form verwendet werden.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Triosephosphat-Isomerase oder deren Teile in in fester Agarose gelöster Form verwendet werden und daß die Lösung in Löcher in der Agarose eingebracht wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Antigen-Antikörper-Reaktion in Anwesenheit von Komplement durchgeführt wird, und daß anschließend ein Indikator für den verbleibenden Rest des Komplements dem Reaktionsprodukt zugegeben wird.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Triosephosphat-Isomerase oder deren Teile als eingebundener Bestandteil einer Lipidmembran verwendet werden, die sich bei erfolgreicher Antigen-Antikörper-Reaktion auflöst.
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß nach der erfolgten Antigen-Antikörper-Reaktion eine markierende Folgereaktion durchgeführt wird.
9. Nachweismittel für Autoantikörper, die als Reaktion auf eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus gebildet wurden, zur Durchführung des Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Nachweismittel mindestens einen Teil des Proteins Triosephosphat-Isomerase in gekoppelter oder fixierte Form aufweist.
10. Nachweismittel gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es aus humanen Zellen gewonnene Triosephosphat-Isomerase aufweist.